

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 16 日 (16.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/054296 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 16/44, (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017959
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-403313 2003 年 12 月 2 日 (02.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社先端生命科学研究所 (ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.) [JP/JP]; 〒3510112 埼玉県和光市丸山台 2 丁目 1 0 番 2 3 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小松 靖彦 (KOMATSU, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒3620042 埼玉県上尾市谷津 2-1-1 A-1 0 5 Saitama (JP). 岩端 寿子 (IWABATA, Hisako) [JP/JP]; 〒3300061 埼玉県さいたま市浦和区常盤 9-1 9-5 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 川口 義雄, 外 (KAWAGUCHI, Yoshio et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿 1 丁目 1 番 1 1 号 友泉新宿御苑ビル 川口国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODIES RECOGNIZING METHYLlysine, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: メチルリジンを認識する抗体及びその製造方法並びにその利用

(57) Abstract: Antibodies capable of recognizing many types of proteins having methyllysine residue are established by immunizing an animal with a chemically methylated protein other than histone and then carrying out a screening or the like depending on the reactivity to a protein obtained by chemically methylating a protein other than the protein employed in the immunization. A process for constructing such an antibody is also established. These antibodies are useful in searching for and studying various methylated proteins. In particular, they are useful in controlling the functions of biological molecules wherein the methylation of a lysine residue plays an important role, and diagnosing a disease by detecting a methyllysine-containing protein.

(57) 要約: 化学的にメチル化したヒストン以外のタンパク質で動物を免疫すること、及び免疫に用いたのとは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質に対する反応性でスクリーニング等を行うことにより、メチルリジン残基を含む多種類のタンパク質を認識し得る抗体を樹立した。加えて、その様な抗体の作製方法を確立した。これらの抗体は様々なメチル化タンパク質の探索、研究に有用であり、殊にリジン残基のメチル化が重要な役割を果たす生体分子機能の制御や、メチルリジン含有タンパク質の検出による疾病診断において有用である。



WO 2005/054296 A1

## 明 細 書

### メチルリジンを認識する抗体及びその製造方法並びにその利用 技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるメチルリジンの検出に使用し得る抗体及びその製造方法並びに該抗体を用いたメチル化タンパク質の検出方法に関する。

### 背景技術

[0002] タンパク質は、翻訳された後そのままの形で機能を発揮する訳ではなく、様々な翻訳後修飾を受けることが知られる。例えば、タンパク質のリン酸化は細胞外シグナルを核まで伝達する際のシグナルカスケードとして、あるいは正常な細胞周期が進行するための制御因子として重要であるし、ヒストンのアセチル化は転写が効率的に進行するために重要である。タンパク質がユビキチン化されるとプロテアソームに運ばれ分解されて活性を失う。一方、小胞体膜に存在するシグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが切り取られることにより、多くのタンパク質は活性型になる。この様に、タンパク質は翻訳後に様々な修飾を受けることにより適切な時期に適切な場所でそれぞれの機能を発揮することになる。

[0003] 近年、注目される様になって来たタンパク質の翻訳後修飾にタンパク質中のリジン残基のメチル化がある。例えば、コアヒストン分子においては、H3及びH4中のリジン残基がメチル化されることが知られ、H3の4番目のリジンのメチル化はH3のアセチル化並びに遺伝子の活性化された部位と正に相関するのに対して、H3の9番目のリジンのメチル化は逆にH3の低アセチル化並びに遺伝子発現が抑制されている部位と正に相関しているという報告がある(非特許文献1)。また、結核菌が上皮細胞へ接着するのに重要なヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)分子が、そのヘパリン結合領域のメチル化によりプロテアーゼに対して抵抗性を増しているという報告もある(非特許文献2)。更に、アミノアシル-tRNA分子のGTP依存的なリボソーム結合を触媒するElongation factor 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ )においても、分子内のいくつかのリジン残基がメチル化されることが知られており(例えば、非特許文献3参照)、メチル化によりEF-1  $\alpha$  活

性が增強されるという報告もある(非特許文献4)。しかし、まだそれほど多くのメチルリジン含有タンパク質が見いだされているわけではなく、タンパク質のメチル化による機能制御がどの程度生体内で重要な役割を果たし、また疾患とどのような関係を有しているかという問題に関する研究はまだあまり進んでいない。今後、種々のメチルリジン含有タンパク質の発見とともに、その機能の解明が期待される現状である。

[0004] タンパク質の翻訳後修飾を検出する有効な手段としては、修飾に特異的なプローブ分子を用いる方法が考えられる。例えば、リン酸化チロシンを認識する抗体は多種市販され、広く活用されている。今後新たな修飾タンパク質を見いだしてゆくのに有用な抗体は、まわりのアミノ酸配列にあまり依存せず、なるべく目的とする修飾アミノ酸の部分のみを認識できる抗体であると考えられる。リン酸化チロシンに関しては、その様な性質の抗体が開発、市販されている。しかし、メチルリジンに関してはその様な抗体についての報告はない。これまでに報告されている抗メチルリジン抗体に関する現状は以下の通りである。

[0005] 既に述べた通り、ヒストンに関してはそのメチル化部位特異的な機能に注目が集まっており、部位特異的にメチル化を解析する目的で部位特異的な認識能力をもつ抗メチル化ヒストン抗体(特許文献1)が開発され市販されているが(SantaCruz社等から市販)、当然のことながら、これらの抗体は広く種々のメチルリジン含有タンパク質を認識するものではない。また、化学的にメチル化したヒストンH1分子を免疫原として取得した抗メチルリジン抗体(ウサギポリクローナル抗体)も開発市販されているが(abcam社)、この抗体はジメチルリジンしか認識できず、またヒストン以外のメチル化タンパク質の認識の能力も不十分なものである。更に、結核菌のHBHA分子を認識し結核菌の肺外への播種を阻止する能力をもつモノクローナル抗体mAb 4057D2がメチル化型のHBHA分子は認識するが、非メチル化型の分子を認識しないこと、及びHBHAと同様にリジンリッチなドメインを持つラミニン結合タンパク質のメチル化型も認識できるということが報告されている。従ってこの抗体はタンパク質の中に存在するメチルリジンのクラスターを認識していると考えられる。しかし、それ以外のリジンリッチなドメインを持たないメチル化タンパク質の認識能に関しては、決して強いものではないと考えられる(非特許文献5)。このように、周辺アミノ酸に影響されることなくタンパ

ク質中のメチルリジン残基を認識し得る抗体について教示、示唆する報告はなく、種々のメチル化タンパク質を幅広く認識する方法はいまだ確立されていない。

- [0006] 上述のように、種々のメチルリジン含有タンパク質の発見とともにその機能の解析が期待されており、このような状況下において、種々のタンパク質中に存在することが予想されるメチルリジン残基を、その周辺アミノ酸の種類にあまり依存しないで認識できる方法の必要性が強く望まれている。その様な方法を確立できれば、メチルリジン含有タンパク質に関する研究が飛躍的に進展することが期待される。

特許文献1:国際公開第02/18418号パンフレット

非特許文献1:M.D. Litt他著、Science (米国)、2001年、293巻、p. 2453

非特許文献2:K. Pethe他著、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(米国)、2002年、99巻、p. 10759

非特許文献3:T.E. Dever他著、J. Biol. Chem.(米国)、1989年、264巻、p. 20518

非特許文献4:W.A. Fonzi他著、Mol. Cell. Biol.(米国)、1985年、5巻、p. 1100

非特許文献5:K. Pethe他著、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(米国)、2002年、99巻、p. 10759

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] タンパク質中のメチルリジン残基を、タンパク質の種類やメチルリジン残基の周辺アミノ酸の種類にあまり影響されずに認識する方法を獲得することが本研究の課題である。特に、そのためのプローブ分子として用いる抗メチルリジン抗体の取得が本発明の主たる課題である。併せて、当該性質を有する抗体を取得するための手段を提供することも本発明の課題である。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者は、化学的にメチル化したタンパク質を免疫原として用いて動物を免疫することによって産生誘導される抗体には、周囲のアミノ酸残基に影響されることなくメチルリジン残基を認識し得る抗体が含まれるとの仮説に基づき鋭意努力を行った結果、このような特性を有する抗体を精製、あるいはモノクローン化することに成功した。

[0009] すなわち、上記課題は以下の手段により解決できる。

- (1) メチルリジンを特異的に認識し、リジンを認識し得ない抗メチルリジン抗体。
- (2) 周辺アミノ酸残基に影響されることなくタンパク質中のメチルリジン残基を特異的に認識し得る抗メチルリジン抗体。
- (3) ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する抗メチルリジン抗体。
- (4) ヒストン以外のタンパク質を化学的にメチル化したものを抗原として用いて動物を免疫する過程を含む方法により得た抗メチルリジン抗体。
- (5) ヒストン以外のタンパク質がスカシガイ(Keyhole limpet)ヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、オボアルブミンから選ばれたものである、上記4に記載の抗体。
- (6) ジメチルリジンに対する反応性がモノメチルリジンに対する反応性よりも優れている上記1乃至5のいずれかに記載の抗体。
- (7) ポリクローナル抗体である上記1乃至6のいずれかに記載の抗体。
- (8) モノクローナル抗体である上記1乃至6のいずれかに記載の抗体。
- (9) ウサギポリクローナル抗体である上記1乃至6のいずれかに記載の抗体。
- (10) マウスモノクローナル抗体である上記1乃至6のいずれかに記載の抗体。
- (11) 抗メチルリジン抗体を産生するハイブリドーマであって、MEK3D7、MEK4E10、MEK5F7、MEK2-5A11及びMEK2-5B11から成る群より選択されるハイブリドーマ。
- (12) 上記11に記載のハイブリドーマより産生される抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体。
- (13) ヒストン以外のタンパク質を化学的にメチル化したものを抗原として用い動物を免疫することを特徴とする、上記1乃至10または12に記載の抗体の製造方法。
- (14) タンパク質がスカシガイ(Keyhole limpet)ヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、オボアルブミンから選ばれたものである、上記13に記載の方法。
- (15) 免疫に用いたものとは異なるタンパク質を化学的にメチル化したものに対する反応性を調べることで抗体価のチェックを行う過程を含む、上記13または14に記載の方法。
- (16) 免疫に用いるタンパク質がスカシガイ(Keyhole limpet)ヘモシアニンであり、抗体価をチェックするタンパク質がウシ血清アルブミンである上記15に記載の方法。

(17) 化学的にメチル化したタンパク質が固相化されたアフィニティーカラムを抗体の精製の過程で用いることを特徴とする上記13乃至16に記載の方法。

(18) 動物がウサギである上記13乃至17に記載の方法。

(19) 動物がマウスである上記13乃至17に記載の方法。

(20) 上記7または9に記載のポリクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を用いたアフィニティー精製を行うことを特徴とする前記方法。

(21) 上記8または10に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫すること、および該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することを特徴とする前記方法。

(22) 上記1乃至10または12に記載の抗体を用いる、メチル化タンパク質の検出方法。

[0010] 本発明により提供される抗メチルリジンモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、疾患の原因や診断マーカーとなりうる新たなメチルリジン含有タンパク質の探索に有用である。更に、本発明により提供される抗メチルリジンモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、リジン残基のメチル化が重要な役割を果たす生体分子機能の制御や、メチルリジン含有タンパク質の検出による疾病診断においても有用である。また、本発明により提供される抗メチルリジン抗体の作製方法は、従来よりも強い活性を持ち、メチルリジン残基の周辺アミノ酸配列に対する許容範囲の広い抗メチルリジン抗体を取得するのに有用である。

[0011] 周辺アミノ酸に影響されることなくタンパク質中のメチルリジンを認識し得る抗体

(1)モノクローナル抗体

化学的にメチル化したタンパク質を免疫原として用いて動物を免疫し、常法に従いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製する。免疫原として用いたタンパク質とは異なるタンパク質をメチル化し、得られたタンパク質に対する反応性を測定することによってメチルリジン残基を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリ

ドーマをスクリーニングする。免疫原に用いたメチル化タンパク質と異なるメチル化タンパク質を用いてスクリーニングを行うことにより特定のタンパク質に限らず様々なタンパク質中のメチルリジン残基を認識する抗体を得ることができる。

- [0012] タンパク質を化学的にメチル化する方法としては、一例として、pH7以上の条件で水素化ホウ素ナトリウム存在下ホルムアルデヒドを作用させる方法を挙げることができるが、何らこの方法に限定されるものではない。
- [0013] 免疫原に用いるタンパク質は、スカシガイ(Keyhole limpet)ヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、ヒト血清アルブミン、トランスフェリン、チログロブリン等の実験に一般に用いられるタンパク質を挙げることができるが、これらに限定されるものでないことは言うまでもない。また、これらタンパク質はヒストンタンパク質のようにリジンリッチ領域を有しないことが望ましい。
- [0014] ヒストンタンパク質はその強い塩基性の原因たるリジン残基を分子内に多量に有しており、全てのヒストンタンパク質には多くのリジンリッチ領域が存在する。そのために、化学的にメチル化したヒストンを免疫原として用いると、メチルリジンリッチな領域に対する抗体が優勢となることが考えられる。実際に、ヒストンH1を化学的にメチル化したものを用いて得られたウサギ抗メチルリジン抗体(Abcam社)は、ヒストンに対する反応性に優れるが、それ以外のタンパク質のメチル化に対する反応性は必ずしも良くない。従って、メチル化して免疫原に用いるタンパク質としては、ヒストンの様な強い塩基性を有し、リジンリッチ領域が多く存在する様なタンパク質は避けるべきである。
- [0015] 抗体価をチェックするためのタンパク質としては、免疫に用いたタンパク質とは異なるタンパク質を同様に化学的にメチル化して用いることができる。例えば、抗原としてメチル化KLHを使用した場合は、抗体価のチェックには化学的にメチル化した、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、ヒト血清アルブミン、トランスフェリン、チログロブリン等を用いることができるが、これらのタンパク質に限定されるものではない。抗体価のチェックには、メチルリジンを免疫に用いた以外のタンパク質に種々の方法で結合させたものや、メチルリジンを直接ELISAプレートに結合させたもの、あるいはメチルリジンを含む合成ペプチドや天然ペプチド、天然タンパク質を用いることができる。
- [0016] (2)ポリクローナル抗体

化学的にメチル化したタンパク質を免疫原として用いて動物を免疫し、抗血清を得る。得られた抗血清をメチル化タンパク質を固相化したアフィニティーカラムを用いて精製することによってメチル化タンパク質を特異的に認識する抗体が得られる。ここで、免疫原として用いたタンパク質とは異なったメチル化タンパク質を固相化したアフィニティーカラムを使用することによって、免疫原タンパク質以外のメチル化タンパク質も幅広く認識し得る抗体を得ることができる。

[0017] 例えば、メチル化KLHで免疫した動物由来の血清を、メチル化BSAを固相化したアフィニティーカラムを用いて精製することによって、メチル化部位を特異的に認識する抗体を得ることができる。アフィニティーカラムとしては、メチルリジンを直接ゲルに結合させたもの、メチルリジンを含む合成ペプチド、天然ペプチド、あるいは天然タンパク質をゲルに結合させたものを用いることもできる。

[0018] 更に、免疫原として用いたタンパク質の非メチル化体を固相化したアフィニティーカラムを用いて非メチル化体に結合する抗体を除去することにより、メチル化タンパク質に対する特異性を向上させることが可能である。

[0019] メチル化タンパク質の検出方法

本発明の抗体を用いた免疫測定法、免疫検出法によって幅広い範囲のメチル化タンパク質を測定、検出することが可能である。これら方法には、酵素免疫測定法(EI A法)、放射性免疫測定法(RIA法)、蛍光標識免疫測定法(FIA法)、ポリスチレン粒子にこの抗体を感作したラテックス凝集法等の方法が含まれる。また、本抗体を用いてウエスタンブロッティングや各種組織染色等を実施することもできる。

発明の効果

[0020] 本発明の抗体は周囲のアミノ酸残基に影響されることなくメチルリジン残基を認識し得ることから、これら抗体を用いることによって従来法よりも多種類のメチル化タンパク質を広範囲に検出し得る方法が提供される。また、これらの抗体を用いることによりリジン残基のメチル化が重要な役割を果たす生体分子機能の制御や、メチルリジン含有タンパク質の検出による疾患診断が可能となる。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 以下、化学的にメチル化して免疫原に用いるタンパク質としてスカシガイ(Keyhole



limpet)ヘモシアニン(KLH)を用いた抗メチルリジン抗体の作製に関して詳しく述べるが、言うまでもなく本発明の実施の形態はこれに限定されるものではない。

[0022] 化学的にメチル化したKLHは例えば以下の方法で作製することができる。10 mgのKLHを1 mlのホウ酸緩衝液(20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>、pH9.3)に溶解し、0.5 mgのホウ素化水素ナトリウムを加える。そこに、ホルマリンを0.5  $\mu$ lずつ5分おきに5回添加し、更に室温で30分反応を進める。反応終了後ゲルろ過カラムで溶媒をPBSに置換する。

[0023] 動物を免疫する方法を、ウサギ及びマウスを例に取り説明する。メチル化KLH溶液をフロインド完全アジュバント、TiterMax Gold (CytRx社)等のアジュバントと1:1に混ぜ、交流ジョイントで結合した二本の注射筒で繰り返しジョイントを通過させる、あるいは超音波処理する等の方法によりエマルジョンを作製する。作製した抗原含有エマルジョンを、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内のいずれか、または複数部位に注入する。一回目の免疫終了の後、1-4週間の間隔を開け、二回目の免疫を同様に実施する。その際、一回目にフロインド完全アジュバントを使用した場合は二回目以降の免疫にはフロインド不完全アジュバントを使用することが望ましい。以後同様に血中の抗メチルリジン抗体の抗体価が上昇するまで、免疫を続ける。

[0024] 抗体価の測定は以下の様に行うことができる。KLHと同様の方法でメチル化したウシ血清アルブミンを10  $\mu$ g/mlの濃度にPBSに溶解し、wellあたり50  $\mu$ lの容量で96穴ELISA plateの各wellに添加し、4℃で一晩吸着する。0.05% Tween 20入りPBS (PBST)で各wellを洗浄後アッセイに用いる。アッセイの前に、1%BSA入りPBST等でブロッキングを行っても良い。マウスの場合は眼窩静脈叢、尾静脈または尾動脈等から、ウサギの場合は耳介静脈または耳動脈等から採血し、PBSTで30倍に希釈した後遠心分離を行う。得られた上清をPBSTで希釈系列を作製し、メチル化BSAをコートしたELISA plateの各wellに50  $\mu$ lずつ添加する。室温で30分反応後、PBSTで洗浄し、PBSTで適切に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG溶液を各wellに50  $\mu$ lずつ添加する。更に室温で30分反応後、オルトフェニレンジアミン等のHRP基質液を添加することにより発色させる。

[0025] マウスモノクローナル抗体を作製する場合は、十分にタイターが上昇していることを確認した後、脾臓を取り出し、脾臓細胞を単離する。別に培養しておいたマウスミエ

ローマ(例えばSP2/0-Ag14等)と、ポリエチレングリコール等を用いることにより融合する。融合に成功した細胞をHAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)培地で選択培養する。7-14日程度、数日おきに培地を半量交換しながら培養を継続した後、培養上清の抗体価を測定する。ポジティブ・ウェルの細胞を限界希釈法にてクローニングし、目的の抗体産生ハイブリドーマを得る。上記方法により得られたハイブリドーマクローンとしては、MEK3D7(受託番号FERM P-19595)、MEK4E10(受託番号FERM P-19596)、MEK5F7(受託番号FERM P-19597)、MEK2-5A11(受託番号FERM P-19593)及びMEK2-5B11(受託番号FERM P-19594)に例示されるものを挙げることができる。

[0026] ウサギポリクローナル抗体を得るためには、十分なタイター上昇を確認した後に採血を実施し、抗メチルリジン抗体含有血清を調製する。

[0027] 精製抗体は以下の手順で得ることができる。モノクローナル抗体の場合は、ハイブリドーマを培養した培養液を抗体精製のソースとすることができる。より大量の抗体を得る際は、ハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、腹水を産生させると、腹水中に高濃度の抗メチルリジン抗体が含まれた試料を得られるので、それを精製の出発材料とすれば良い。ポリクローナル抗体の場合は抗体が含まれている血清を用いる。

[0028] 免疫に用いた抗原とは異なるメチル化タンパク質を固相化したアフィニティークラムを用いて抗体を精製することができる。メチル化タンパク質を固相化したアフィニティークラムは例えば以下の方法で得ることができる。アルデヒドあるいはN-ヒドロキシスクシンイミド等で活性化されたアガロースあるいはセファロース等の担体に、ウシ血清アルブミン等の、免疫の際に用いたタンパク質とは異なるタンパク質を固相化する。次いで、ホルマリンとホウ素化水素ナトリウムを用いて、固相化されたタンパク質をメチル化する。この様な操作を行うことによりメチル化タンパク質が固相化されたアフィニティークラムを得ることができる。アフィニティークラムを作製する方法としては、メチルリジン自体をゲルに固相化しても良く、またメチルリジンを含むペプチドを固相化しても良い。上記方法で作製したアフィニティークラムに、抗体を含む溶液を流し、PBS等の緩衝液で十分洗浄後に、酸性条件等で溶出することにより、精製抗体を得られる。

- [0029] 上記アフィニティー精製の前あるいは後に、protein G、protein Aあるいは Protein L等の抗体結合タンパク質を固相化したカラムで精製してもよい。
- [0030] 上記方法で得られた抗体が、周囲のアミノ酸配列にあまり依存せずにメチルリジン残基を認識していることは、例えば以下の様な方法で確認することができる。まず、当該抗体が、メチルリジン残基を認識していることは、固相化したメチル化タンパク質に対する抗体の反応性が、外部から添加したモノメチルリジン、ジメチルリジンあるいはトリメチルリジンにより阻害されるが、リジンによっては阻害されないことにより確認できる。更に、周囲のアミノ酸配列にあまり依存しないことは、異なるタンパク質を化学的にメチル化したものをそれぞれ固相化したもののいずれに対しても強い結合活性を示すことを調べることにより確認できる。更に、動物細胞可溶化物を電気泳動後、PVDF膜あるいはニトロセルロース膜に転写し、抗体によりWestern blottingの手法で染色した時に、複数のタンパク質が染色されることでも示される。更に、動物細胞化溶化物を抗メチルリジン抗体で免疫沈降した時に、その免疫沈降物の中に、免疫に用いたものとは異なるメチル化タンパク質、例えばEF-1 $\alpha$ が含まれ、また逆にメチル化されていることが知られているEF-1 $\alpha$ の抗体による免疫沈降物の中に、抗メチルリジン抗体で染色されるバンドを検出できることでも示される。
- [0031] 本発明により提供される抗体は、疾病の診断や治療に有用な新たな標的分子としてのメチルリジン含有タンパク質の探索に有用であるのみならず、有望な標的分子の発見の暁には、その機能制御の目的や、診断の目的で使用する事ができる。

## 実施例 1

- [0032] 抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

MEK3D7、MEK4E10、MEK5F7、MEK2-5A11及びMEK2-5B11に例示される抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは以下の方法で作製した。

- [0033] 尚、上記ハイブリドーマは、国際微生物寄託機関である独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、平成15年11月21日付けでそれぞれ受託番号 FERM P-19595、FERM P-19596、FERM P-19597、FERM P-19593およびFERM P-19594として寄託され、平成16年12月1日付けで国際寄託へ移管するための申請を行い、それぞれ受領番号FERM ABP-10168、FERM ABP-10169、FERM

ABP-10170、FERM ABP-10166及びFERM ABP-10167として受領された。

- [0034] マウスの免疫は以下の様に実施した。メチル化KLH溶液をTiterMax Gold (CytRx社)と1:1に混ぜ、交流ジョイントで結合した二本の注射筒で繰り返しジョイントを通過させ、エマルジョンを作製した。作製した抗原含有エマルジョンを、皮下あるいは腹腔内のいずれかに、1〜4週間の間隔を開け、三回または四回免疫を行った。一回の抗原量は50-100  $\mu$ gのメチル化KLHを使用した。KLHと同様の方法でウシ血清アルブミン(以下BSAを記載する)をメチル化したものをELISA plateに固相化し、後述の方法で血液中の抗体価の上昇を確認したら、ミエローマとの融合の4日前にPBSで溶解したメチル化KLHを腹腔内に、3日前に尾静脈内に投与した(投与量は、100  $\mu$ g/mouse)。
- [0035] 尚、抗体価の測定は以下の様に行った。KLHと同様の方法でメチル化したウシ血清アルブミンを10  $\mu$ g/mlの濃度にPBSに溶解し、wellあたり50  $\mu$ lの容量で96穴ELISA plateの各wellに添加し、4°Cで一晩吸着した。0.05% Tween 20入りPBS (PBST)で各wellを洗浄後アッセイに用いた。採血は尾動脈から行い、PBSTで30倍に希釈した後遠心分離を行った。得られた上清をPBSTで希釈系列を作製し、メチル化BSAをコートしたELISA plateの各wellに50  $\mu$ lずつ添加した。室温で30分反応後、PBSTで洗浄し、PBSTで適切に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウスIgG溶液を各wellに50  $\mu$ lずつ添加する。更に室温で30分反応後、オルトフェニレンジアミンを基質として用い492 nmにおける吸光度を測定することにより活性を評価した。
- [0036] 抗体産生細胞とミエローマの融合は以下の様に行った。静脈内への抗原投与の三日後に脾臓を取り出し、脾臓細胞を単離した。その $5 \times 10^7$ 個を、別に培養しておいてマウスミエローマSP2/0-Ag14の $1 \times 10^7$ 個と、ポリエチレングリコールを用いることにより融合した。融合に成功した細胞をHAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)培地で選択培養した。11日間、数日おきに培地を半量交換しながら培養を継続した後、培養上清の抗体価を測定した。ポジティブ・ウェルの細胞を限界希釈法にてクローニングし、目的の抗体産生ハイブリドーマを得た。
- [0037] 得られたハイブリドーマクローンMEK3D2、MEK3D7、MEK4E10、MEK5F5、

MEK5F7、MEK2-1A3、MEK2-1H9、MEK2-5A11、MEK2-5B11及びMEK2-5G1由来の各抗体のアイソタイプはそれぞれ、IgG2a  $\kappa$ 、IgG1  $\kappa$ 、IgG1  $\kappa$ 、IgG2a  $\lambda$ 、IgG2a  $\lambda$ 、IgG2a  $\lambda$ 、IgG3  $\kappa$ 、IgG2b  $\kappa$ 、IgG2a  $\lambda$  及びIgG2a  $\lambda$  であった。

- [0038] 図1に、この様にして得られたハイブリドーマの培養上清から、protein Gカラムで精製した抗体の反応性を、ELISA法で調べた結果を示す。方法は、血液中の抗体価の測定方法と同じである。図に示される様に、いずれの培養上清中にも固相化したメチル化BSAに反応する抗体が含まれていることが分かった。

## 実施例 2

- [0039] 抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体の作製

抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体は以下の手順で作製した。ウサギ(雌性日本白色種)二羽に、メチル化KLHを、第1回目は0.15 mg/匹の用量で、2回目から5回目は0.3 mg/匹の用量で免疫を実施した。1回目は、フロインド完全アジュバントとのエマルジョンとして、2回目以降はフロインド不完全アジュバントとのエマルジョンとして、背部皮下投与した。免疫は全て2週間間隔で行い、最終免疫の1週間後に全採血を実施して抗血清を調製した。抗血清は2羽分合計で118 ml得られた。

- [0040] 図2に精製した抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体の、固相化したメチル化BSAに対する反応性をELISA法にて測定した結果を示した。本方法により、確かに反応性を持つ抗体が取得できたことが分かった。

## 実施例 3

- [0041] アフィニティーカラムによる抗メチルリジン抗体の精製

ポリクローナル抗体を含む抗血清からメチル化タンパク質を固相化したアフィニティーカラムを用いた精製を行った。

- [0042] メチル化タンパク質固相化アフィニティーカラムの作製は以下の方法で行った。まず、第一段階として、BSAを固相化した担体を作製した。固相化には、Pierce社のAminolink Immobilization kitを用いた。アルデヒドで活性化されたアガロース担体2 mlを、5 mlのcoupling bufferで平衡化後、coupling buffer 2 mlに溶かした10 mgのBSAを添加した。更に200  $\mu$  lのreductant溶液を加え、室温で6時間結合させた。担体を5 mlのcoupling bufferで洗浄後、1 Mエタノールアミンを5 ml加え、200  $\mu$  lのreductant

溶液を加えた後、室温で30分反応させた。反応終了後、5 mlのwash solutionで4回洗浄後、0.5 Mホウ酸緩衝液(pH9.4)で平衡化した。ドレイン後、2 mlのホウ酸緩衝液に溶かした2 mgの $\text{NaBH}_4$ を添加し、更にホルマリンを2  $\mu\text{l}$ ずつ5分おきに5回添加した。室温で30分反応を進めた後、PBSで洗浄した。

[0043] カラムをPBSで平衡化後、抗血清48 mlをPBS 48 mlで希釈後に、カラムにアプライした。10 mlのPBSで洗浄後、Pierce社のIgG Elution bufferで溶出した(1 ml $\times$ 10フラクション)。各フラクションは速やかに100  $\mu\text{l}$ の1M Tris-HCl, pH7.4で中和した。280 nmの吸光度でタンパク質の溶出しているフラクションを調べ、プールした後に、ゲルろ過カラム(Amersham Bioscience社、PD-10)で溶媒をPBSに置換した。これにより、抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体10.2 mgが得られた。

[0044] また、上記アフィニティーカラムはモノクローナル抗体の精製にも用いることができる。抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体の精製の一例を以下に示す。プリスタン0.5 mlを腹腔内に投与後7日後の雌性Balb/cマウスの腹腔に、約 $10^7$  cells/mouseのMEK3D7ハイブリドーマ細胞を投与した(1 mlのPBS懸濁液として)。9日後にマウスをエーテル麻酔で安楽死させた後、腹水を回収した。腹水2 mlをPBSで二倍希釈し、PBSで平衡化したアフィニティーカラムにアプライした。PBSで洗浄後IgG Elution bufferで溶出した(1 mlずつ。各フラクションは50  $\mu\text{l}$ の1M Tris-HCl, pH8.0で中和)。280 nmの吸光度でタンパク質の存在するフラクションを調べ、プールした後、ゲルろ過(PD-10)で溶媒をPBSに置換した。これによりMEK3D7抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体8.5 mgが得られた。

#### 実施例 4

[0045] 種々のメチル化タンパク質に対する抗体の反応性の測定

得られた抗体がメチルリジン残基の周辺のアミノ酸配列に依存せずにメチルリジンを認識できるのであれば、リジン残基を含む任意のタンパク質を化学的にメチル化したものに対していずれにも反応性を示すはずである。また、メチル化していないタンパク質に対する反応性は、メチル化したタンパク質に対する反応性に比して、著しく低いはずである。図3に今回樹立した各モノクローナル抗体及びウサギポリクローナル抗体が、BSA、KLH、及び卵白アルブミン(OVA)の各タンパク質、及びそれぞれを

既述の方法で化学的にメチル化したもの(それぞれ、MeK-BSA、MeK-KLH、及びMeK-OVA)を固相化したものにどの様に反応するかをELISA法を用いて調べた結果を示した。モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体はいずれも、MeK-BSA、MeK-KLH、及びMeK-OVAのいずれに対しても強い反応性を示したのに対して、いくつかの例外を除いてメチル化していない各タンパク質にたいしてはほとんど反応性を示さなかった。モノクローナル抗体の中では、MEK5F7が高濃度で非メチル化OVAに弱い反応性を、MEK2-5B11が3種の非メチル化タンパク質に対してやや強い反応性を示したが、いずれもメチル化したタンパク質に対する反応性に較べると1000倍以上の抗体濃度が必要であり、これらはいずれもメチル化部位特異的抗体であると言えることができる。一方、ウサギポリクローナル抗体は非メチル化型のKLHにかなり強い反応性を示した。この原因は不明であるが、必要抗体濃度の観点から言えば、やはりメチル化部位特異的抗体と言える。この非特異的反応を示す抗体を取り除きたい場合は、非メチル化KLHを固相化したカラムで吸収を行えば良い。

## 実施例 5

### [0046] 抗体反応のメチルリジンによる阻害の確認

リジンの $\epsilon$ -アミノ基のメチル化体には、モノメチルリジン、ジメチルリジン、トリメチルリジンの3種が存在する。このいずれに対する反応性が強いのか、またメチルリジンに対する特異性はどうかを更に確認するために、各修飾アミノ酸による競合実験を実施した。10  $\mu$ g/mlの濃度のメチル化BSAを50  $\mu$ l/well用いて抗原をELISA plateに吸着した後、1  $\mu$ g/mlの各抗体を種々の濃度の修飾リジンまたは未修飾のリジンと共存下反応させ、固相に結合できた抗体の量を、HRP 標識抗マウスIgG抗体により検出した(基質はオルトフェニレンジアミン)。結果を図5に示した。モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体ともに、ジメチルリジンにより最も良く競合された。モノクローナル抗体の中には更にモノメチルリジンでも競合されるものもあり、MEK3D2は弱くではあるがトリメチルリジンによっても競合傾向が見られた。しかし、いずれの抗体も未修飾のリジンのみによっては競合されなかった。ポリクローナル抗体は調べた濃度範囲では、ジメチルリジンのみにより競合された。

[0047] 以上の結果は、今回樹立した抗体は、いずれもメチルリジンを認識していることを示

しており、中でもジメチルリジンに対する特異性が高い傾向にあることが分かる。

## 実施例 6

### [0048] 動物細胞可溶化物のWestern blottingによる分析

動物細胞内に存在すると考えられる種々のメチルリジン含有タンパク質を樹立した抗体が検出できるかどうか確かめるために、細胞可溶化物のWestern blottingによる分析を実施した。ヒトT細胞白血病細胞株であるMOLT-4Fを2% SDS、62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8で可溶化し、12% SDSポリアクリルアミドゲルに30  $\mu$ g/laneの用量をアプライし電気泳動を実施した。PVDF膜に電気泳動で分離されたタンパク質を転写した後に、1  $\mu$ g/mlの濃度でTBSTに溶かした各抗体を転写後の膜とインキュベートした。30分後に膜を洗浄し、マウスモノクローナル抗体の場合はHRP標識抗マウスIgG、ウサギポリクローナル抗体の場合はHRP 標識抗ウサギIgGと反応させ、洗浄後Amersham Bioscience社のECL Plus化学発光試薬によりバンドを検出した。結果を図5に示した。図に示される通り、ここに例示したいずれのマウスモノクローナル抗体も複数のメチル化タンパク質と思われるバンドを検出しており、細胞内のメチル化タンパク質の検出に有用であることが示された。尚、ここにデータは示していないが、それ以外の抗メチルリジンモノクローナル抗体でも同様に複数のバンドが検出できることは確認済みである。また、今回作製したウサギポリクローナル抗体も同様に複数のメチル化タンパク質と思われるバンドを検出できることが分かる。比較のために、abcam社から市販されている抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体を同じ濃度で反応させた結果も併せて示したが、今回樹立したモノクローナル抗体やポリクローナル抗体に較べて検出できるバンドは多くなく、今回示した方法を用いることで、より優れた抗体が作製できることが明らかになった。また、図中分子量14.4kと21.5kの間のバンドはヒストンであるが、このバンド強度の比較からも、今回樹立した抗メチルリジン抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体問わず、市販の抗体よりも優れていることが分かる。

## 実施例 7

### [0049] 動物細胞可溶化物の免疫沈降による分析

樹立した抗体により、既にメチル化されることが知られている分子のメチル化を検出



できるかどうかを確かめるために、免疫沈降法を用いた確認実験を行った。

Elongation factor 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) は分子内の数カ所がメチル化されることが知られている分子量約50kDのタンパク質で、図5の50kD付近の分子量の位置のバンドがそれに当たる可能性が高い。このことを確かめるために、MOLT-4F細胞をプロテアーゼ阻害剤混合物 (Complete Mini EDTA-free, Roche社) を加えた lysis buffer (120 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH8.0) で可溶化した後、抗メチルリジン抗体 MEK2-5B11 又は市販の抗 EF-1  $\alpha$  抗体 (Upstate社、clone CBP-KK1) を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動で展開後、PVDF膜に転写し、HRP 標識した抗メチルリジン抗体 MEK3D7 または抗 EF-1  $\alpha$  抗体で検出した。抗 EF-1  $\alpha$  抗体を使用した際は、二次抗体として、HRP 標識抗マウス IgG を用いた。発色は Amersham Bioscience 社の ECL plus で行った。結果を図6に示す。図は、分子量50kDの周辺を拡大して示したものである。図に示される様に、抗メチルリジン抗体 MEK2-5B11 で免疫沈降したものは、別の抗メチルリジン抗体 MEK3D7 で検出されると同時に、EF-1  $\alpha$  に対する抗体でも検出された。一方、抗 EF-1  $\alpha$  抗体で免疫沈降したものも逆に抗メチルリジン抗体 MEK3D7 で検出された。以上の結果は、今回樹立した抗メチルリジン抗体 MEK3D7 及び MEK2-5B11 がいずれも EF-1  $\alpha$  のメチル化部位を認識可能であることを示している。この結果は図5に見られる分子量約50kDのバンドが EF-1  $\alpha$  であることを示唆しており、このバンドの検出力の比較により、今回樹立したモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれもが、市販の抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体よりも優れていることが分かった。

## 実施例 8

### [0050] 二次元電気泳動による細胞内メチルリジン含有タンパク質の分析

MOLT-4F細胞を9.8M Urea、0.5% CHAPS、10 mM DTTで可溶化後、50  $\mu$ gのタンパク質を、pHレンジ3-10の等電点電気泳動で一次元目の展開をし、更に12%SDSポリアクリルアミドゲルにて、二次元目の展開を行った。PVDF膜に転写後、HRP標識した抗メチルリジン抗体 MEK3D7 により検出した結果を図7に示した。図に示される通り、本抗体により複数のメチルリジン含有タンパク質のスポットが検出されることが分かる。

。

### 図面の簡単な説明

- [0051] [図1]抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体の固相化メチルBSAに対する反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。(A) clone MEK3D2、MEK3D7、MEK4E10、MEK5F5、及びMEK5F7により産生されるマウスモノクローナル抗体に関する結果、(B) clone MEK2-5G1、MEK2-1H9、MEK2-1A3、MEK2-5A11、及びMEK2-5B11により産生されるマウスモノクローナル抗体に関する結果。
- [図2]抗メチルリジンウサギポリクローナル抗体の固相化メチルBSAに対する反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図3-1]メチル化及び非メチル化BSA、KLH及びOVAに対する抗メチルリジンモノクローナル抗体MEK3D2の反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図3-2]メチル化及び非メチル化BSA、KLH及びOVAに対する抗メチルリジンモノクローナル抗体(B)MEK 3D7および(C)MEK 4E10の反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図3-3]メチル化及び非メチル化BSA、KLH及びOVAに対する抗メチルリジンモノクローナル抗体(D)MEK 5F5および(E)MEK 5F7の反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図3-4]メチル化及び非メチル化BSA、KLH及びOVAに対する抗メチルリジンモノクローナル抗体(F)MEK 2-1A3および(G)MEK 2-1H9の反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図3-5]メチル化及び非メチル化BSA、KLH及びOVAに対する抗メチルリジンモノクローナル抗体(H)MEK 2-5A11および(I)MEK 2-5B11の反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図3-6]メチル化及び非メチル化BSA、KLH及びOVAに対する抗メチルリジンモノクローナル抗体(J)MEK 2-5G1および(K)ウサギポリクローナル抗体の反応性をELISA法にて調べた結果を表した図。
- [図4-1]抗メチルリジン抗体MEK3D2の固相化メチルBSAに対する反応性に対するリジン、モノメチルリジン、ジメチルリジン及びトリメチルリジンによる阻害を調べた結果を

表した図。

[図4-2]抗メチルリジン抗体(B)MEK 3D7および(C)MEK 4E10の固相化メチルBSAに対する反応性に対するリジン、モノメチルリジン、ジメチルリジン及びトリメチルリジンによる阻害を調べた結果を表した図。

[図4-3]抗メチルリジン抗体(D)MEK 5F5および(E)MEK 5F7の固相化メチルBSAに対する反応性に対するリジン、モノメチルリジン、ジメチルリジン及びトリメチルリジンによる阻害を調べた結果を表した図。

[図4-4]抗メチルリジン抗体(F)MEK 2-1A3および(G)MEK 2-1H9の固相化メチルBSAに対する反応性に対するリジン、モノメチルリジン、ジメチルリジン及びトリメチルリジンによる阻害を調べた結果を表した図。

[図4-5]抗メチルリジン抗体(H)MEK 2-5A11および(I)MEK 2-5B11の固相化メチルBSAに対する反応性に対するリジン、モノメチルリジン、ジメチルリジン及びトリメチルリジンによる阻害を調べた結果を表した図。

[図4-6]抗メチルリジン抗体(J)MEK 2-5G1および(K)ウサギポリクローナル抗体の固相化メチルBSAに対する反応性に対するリジン、モノメチルリジン、ジメチルリジン及びトリメチルリジンによる阻害を調べた結果を表した図。

[図5]MOLT-4F細胞可溶化物中のメチルリジン含有タンパク質をWestern blottingの手法を用い、各モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体で検出した結果を表した図。

[図6]MOLT-4F細胞可溶化物中から抗メチルリジン抗体または抗EF-1 $\alpha$ 抗体で免疫沈降したサンプルを、抗メチルリジン抗体及び抗EF-1 $\alpha$ 抗体によるWestern blottingで検出した結果を表した図。

[図7]MOLT-4F細胞可溶化物を二次元電気泳動で展開後、HRP標識MEK3D7抗体で検出した結果を表した図。

紙面による写し (注意: 電子データが原本となります)  
 [この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0-1	様式-PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	JP0-PAS 0321
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	SAP-717-PCT
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0033
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IP0D 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IP0D)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
1-3-3	寄託の日付	2003年 11月 21日 (21. 11. 2003)
1-3-4	受託番号	IP0D 19593
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	段落番号	0033
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	IP0D 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IP0D)
2-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
2-3-3	寄託の日付	2003年 11月 21日 (21. 11. 2003)
2-3-4	受託番号	IP0D 19594
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
3-1	段落番号	0033
3-3	寄託の表示	
3-3-1	寄託機関の名称	IP0D 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IP0D)
3-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
3-3-3	寄託の日付	2003年 11月 21日 (21. 11. 2003)
3-3-4	受託番号	IP0D 19595
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

紙面による写し (注意: 電子データが原本となります)  
 [この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

4	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
4-1	段落番号	0033
4-3	寄託の表示	
4-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
4-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6
4-3-3	寄託の日付	2003年 11月 21日 (21. 11. 2003)
4-3-4	受託番号	IPOD 19596
4-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
5	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
5-1	段落番号	0033
5-3	寄託の表示	
5-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
5-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6
5-3-3	寄託の日付	2003年 11月 21日 (21. 11. 2003)
5-3-4	受託番号	IPOD 19597
5-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

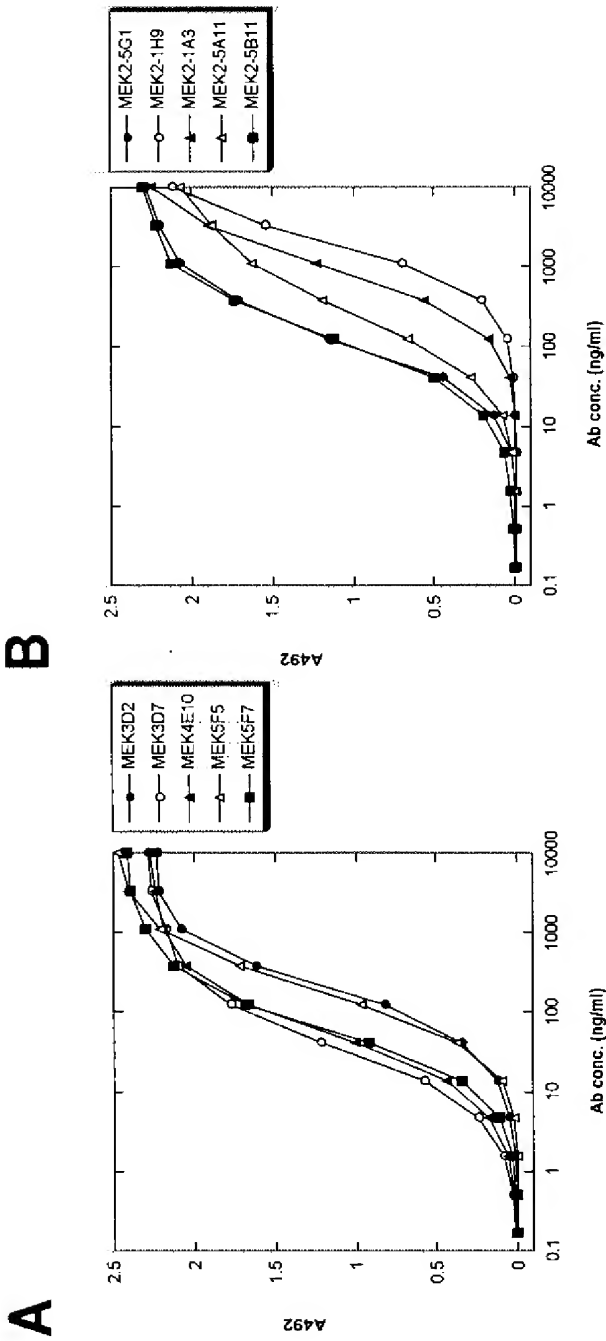
国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

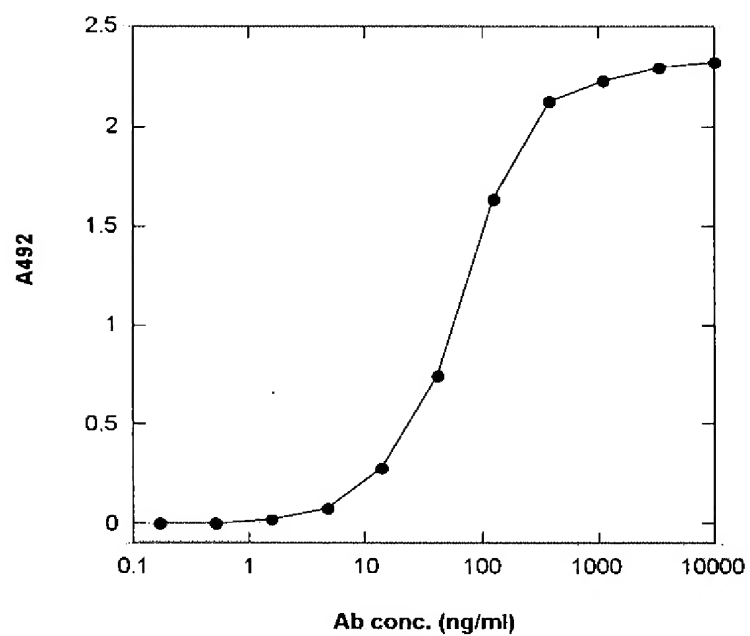
## 請求の範囲

- [1]      メチルリジンを特異的に認識し、リジンを認識し得ない抗メチルリジン抗体。
- [2]      周辺アミノ酸残基に影響されることなくタンパク質中のメチルリジン残基を特異的に認識し得る抗メチルリジン抗体。
- [3]      ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する抗メチルリジン抗体。
- [4]      ジメチルリジンに対する反応性がモノメチルリジンに対する反応性よりも優れている請求項1乃至3のいずれかに記載の抗体。
- [5]      ポリクローナル抗体である請求項1乃至4のいずれかに記載の抗体。
- [6]      モノクローナル抗体である請求項1乃至4のいずれかに記載の抗体。
- [7]      抗メチルリジン抗体を産生するハイブリドーマであって、MEK3D7、MEK4E10、MEK5F7、MEK2-5A11及びMEK2-5B11から成る群より選択されるハイブリドーマ。
- [8]      請求項7に記載のハイブリドーマより産生される抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体。
- [9]      請求項5に記載のポリクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質またはメチルリジンを用いたアフィニティー精製を行うことを特徴とする前記方法。
- [10]     請求項6に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫すること、および該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することを特徴とする前記方法。
- [11]     請求項1乃至6または8に記載の抗体を用いる、メチル化タンパク質の検出方法。

[ 1 ]



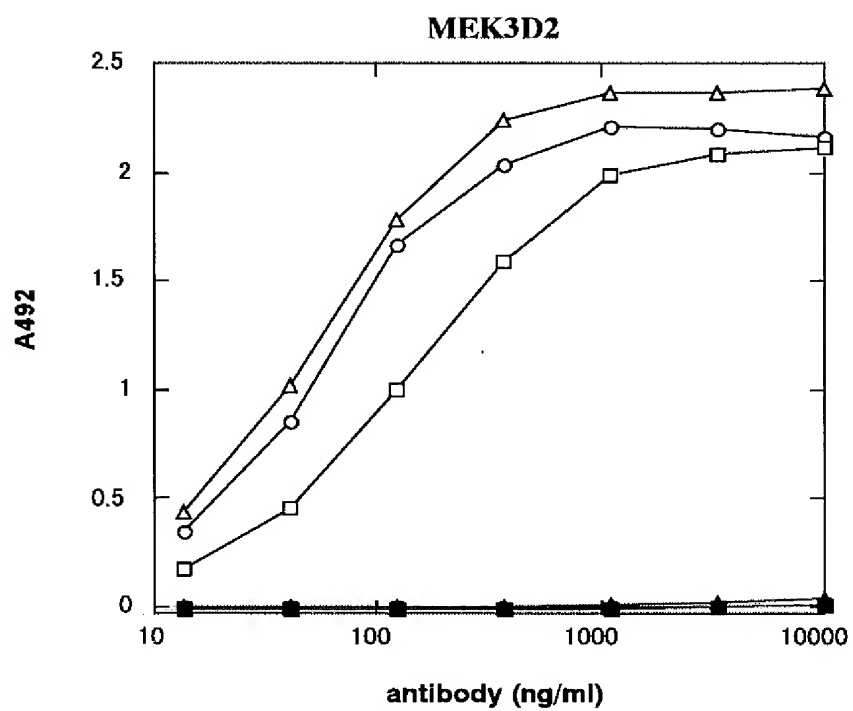
[図2]





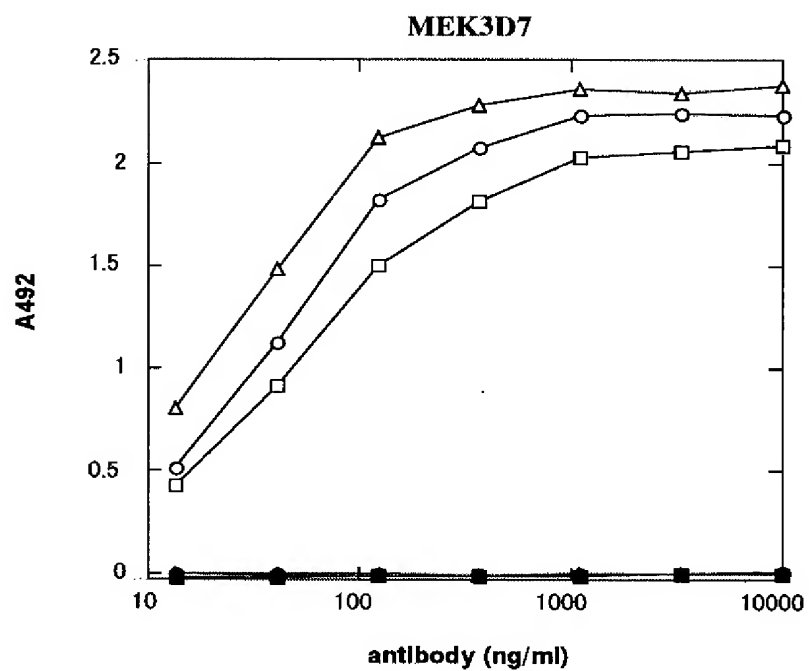
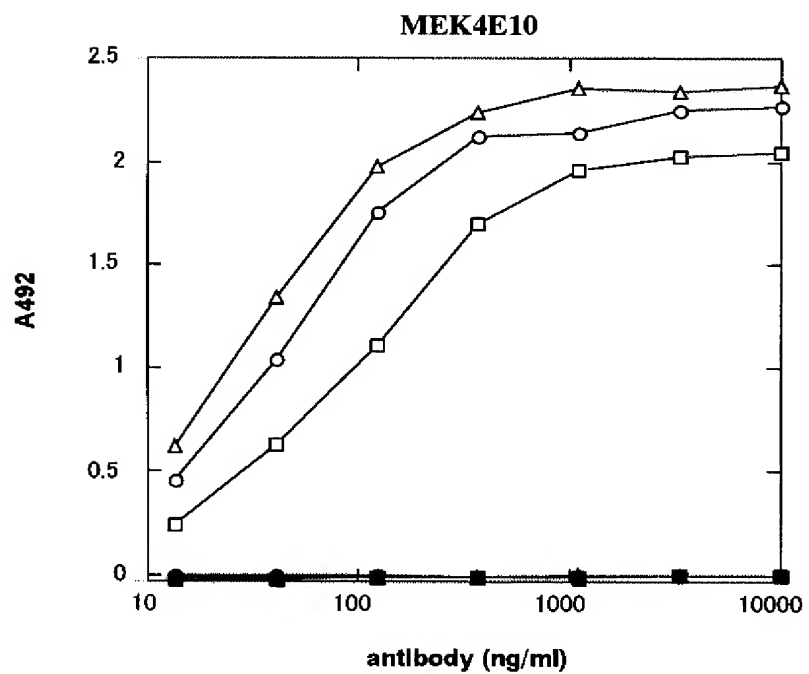
[図3-1]

A



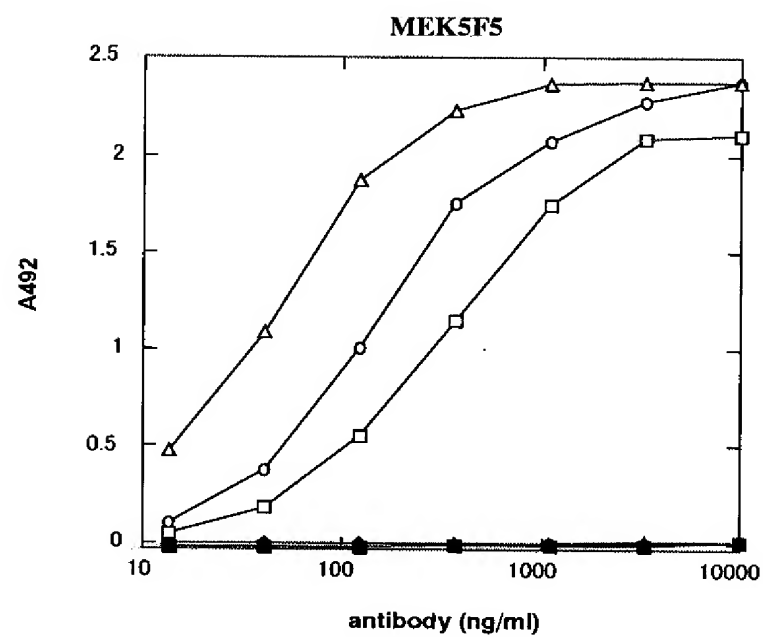
- BSA
- MeK-BSA
- ▲— KLH
- △— MeK-KLH
- OVA
- MeK-OVA

[図3-2]

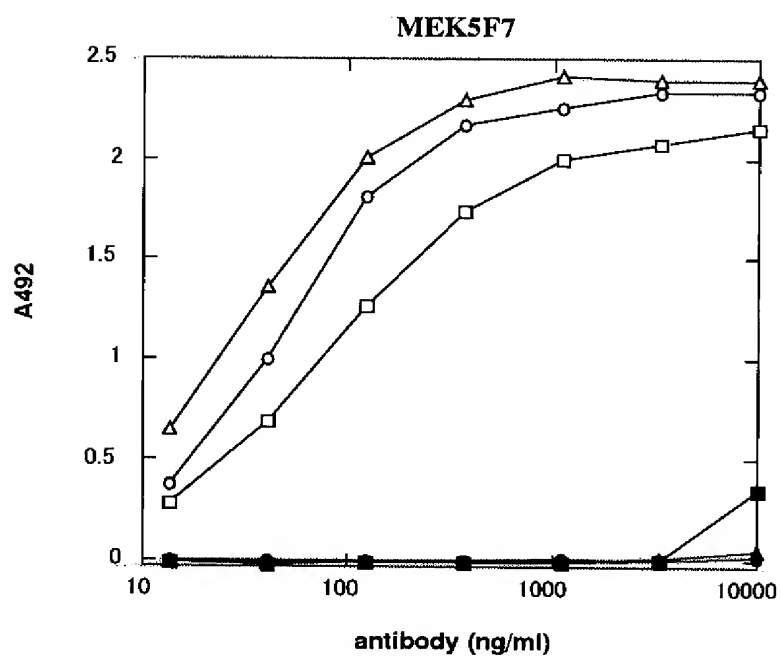
**B****C**

[図3-3]

D

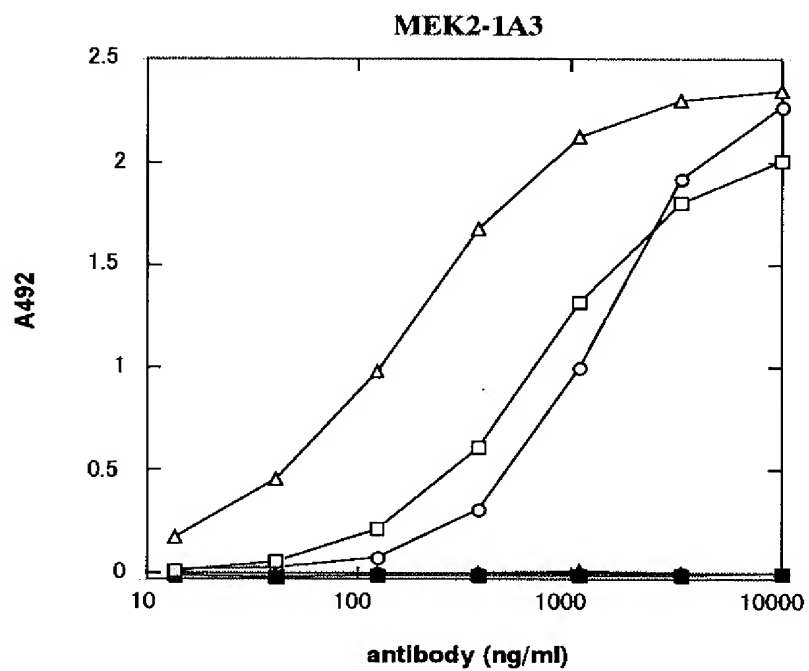


E

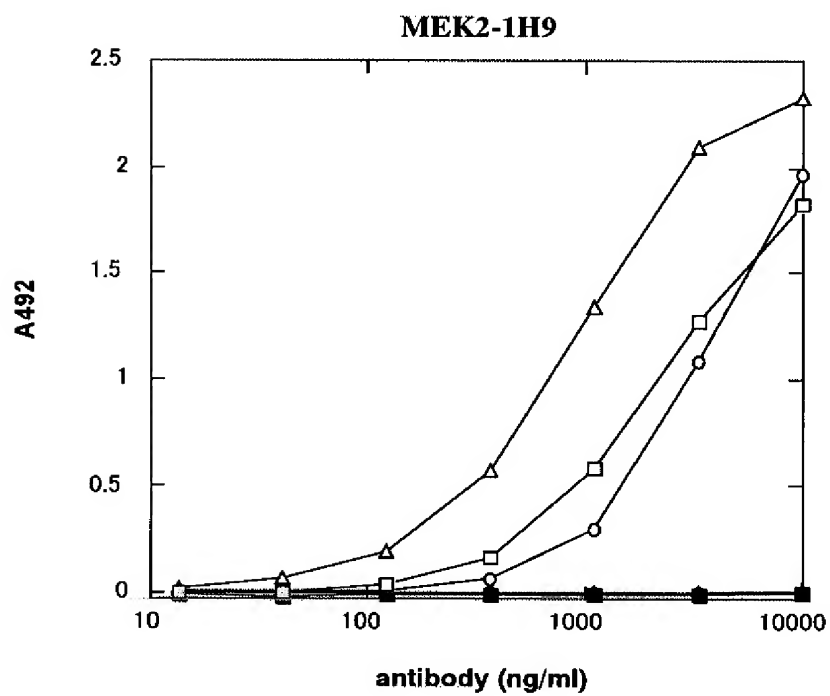


[図3-4]

F



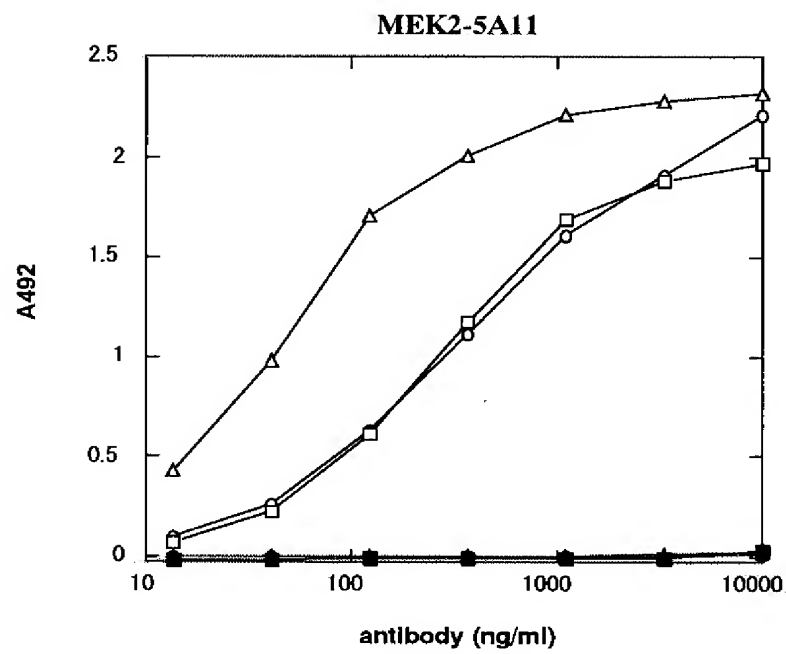
G



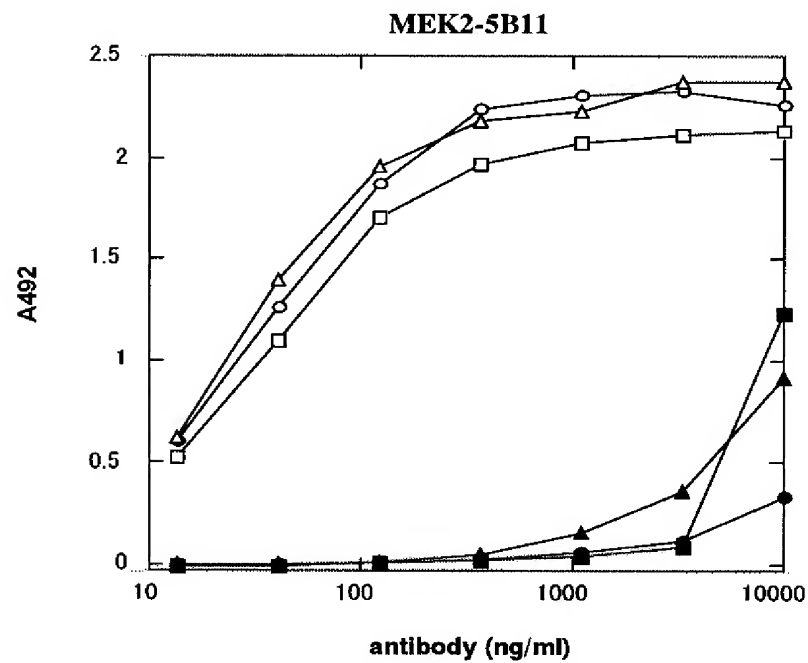
[図3-5]

H

I

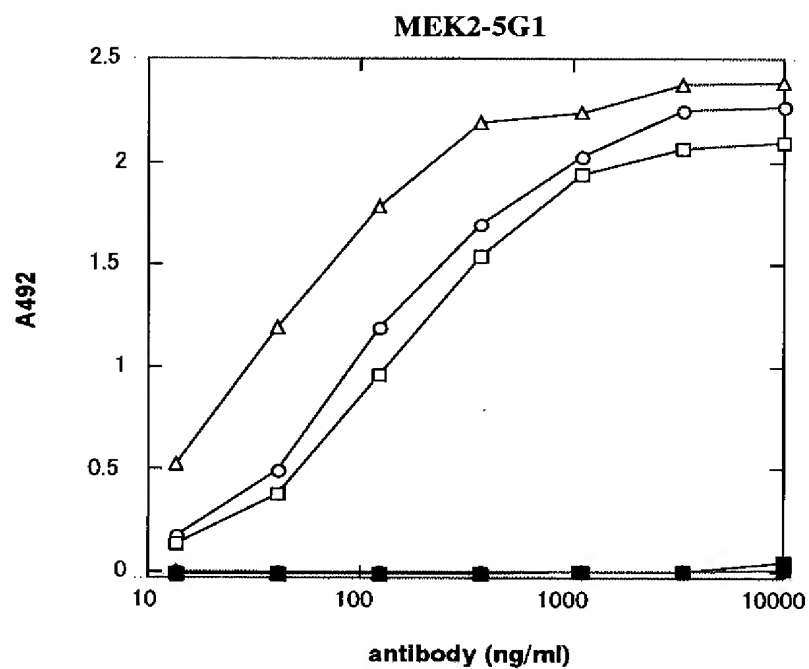


I

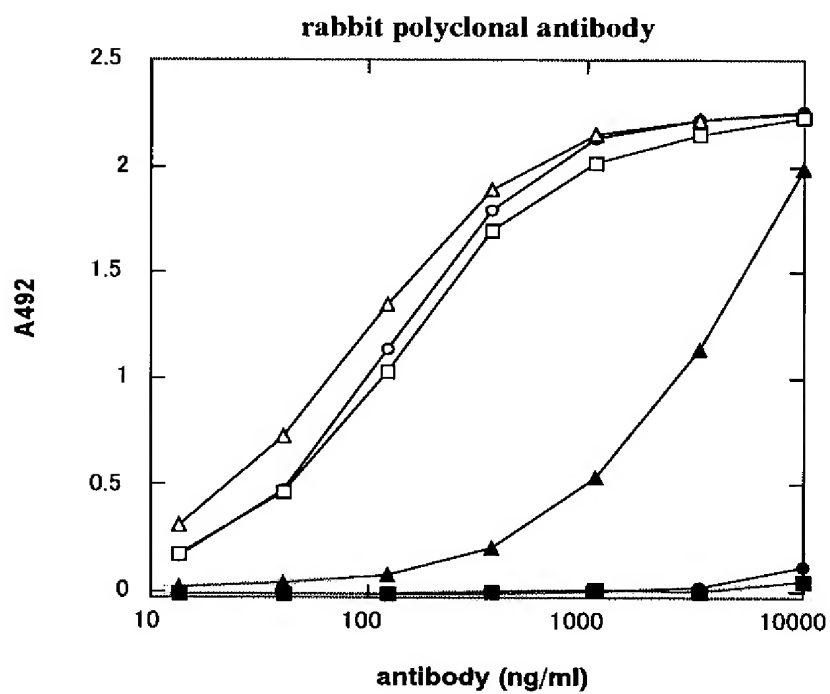


[図3-6]

J

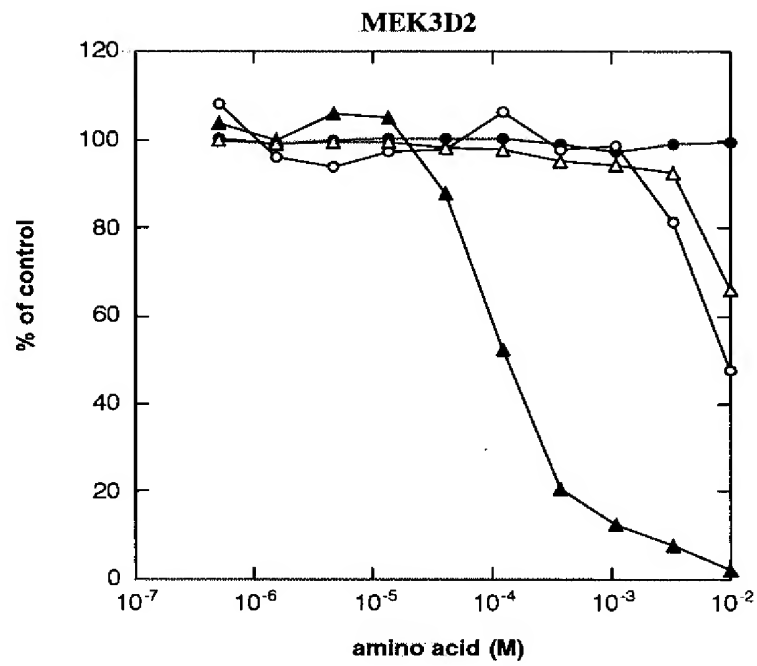


K



[図4-1]

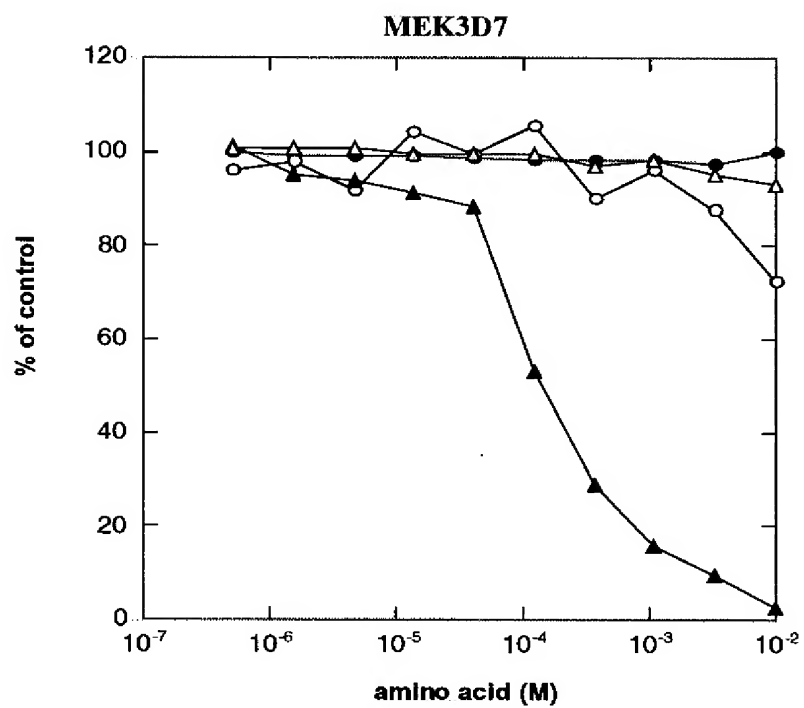
A



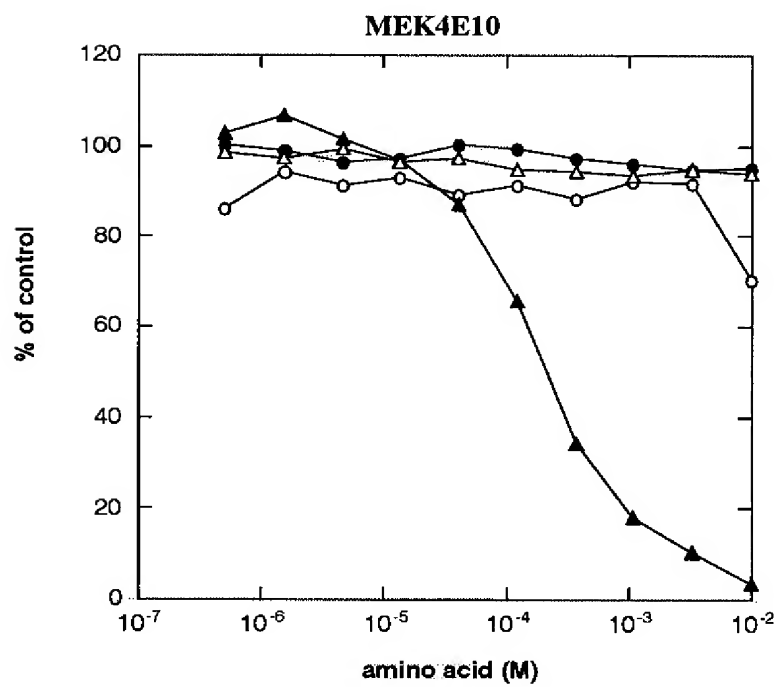
—●— Lys  
—○— Lys(Me)  
—▲— Lys(Me)2  
—△— Lys(Me)3

[図4-2]

B



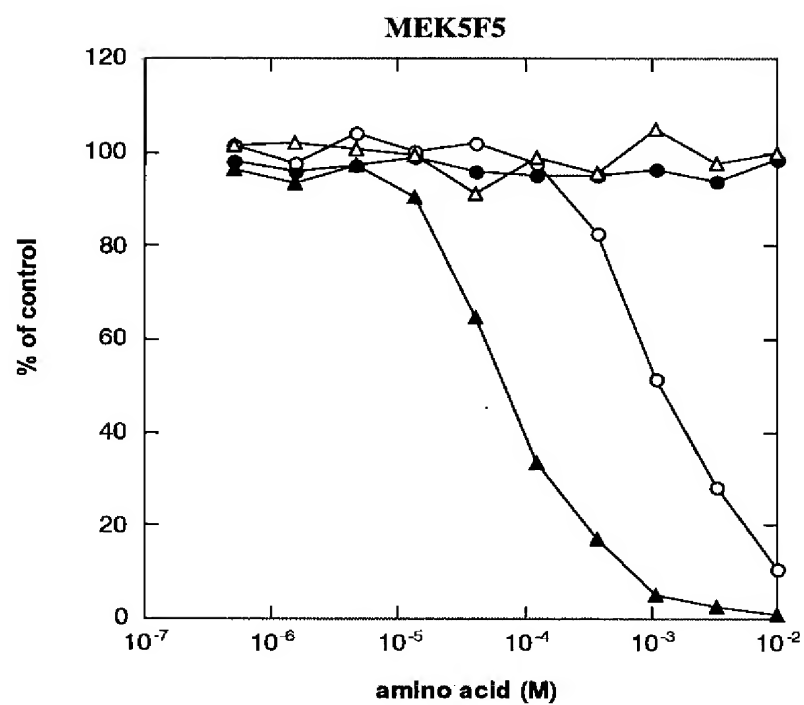
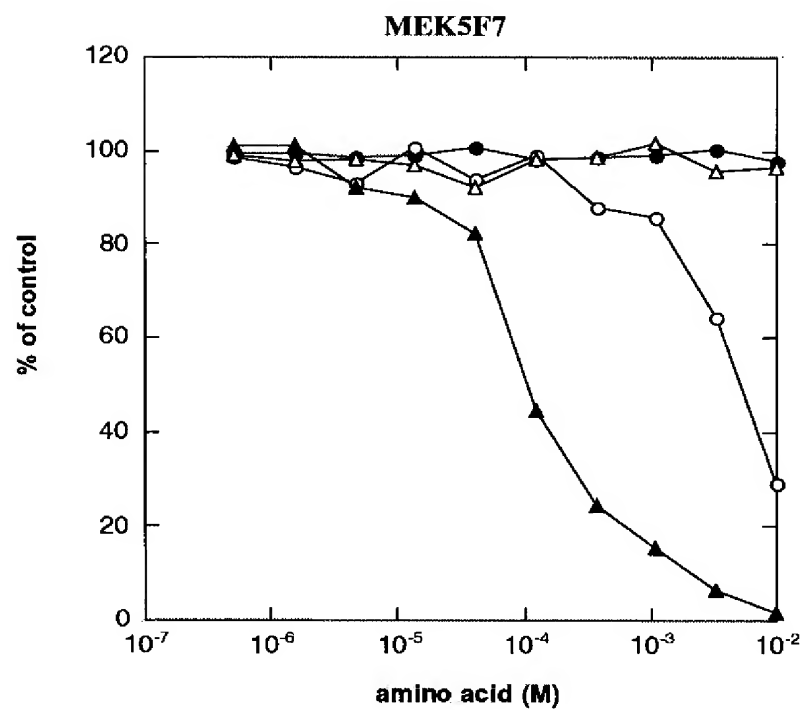
C





11/15

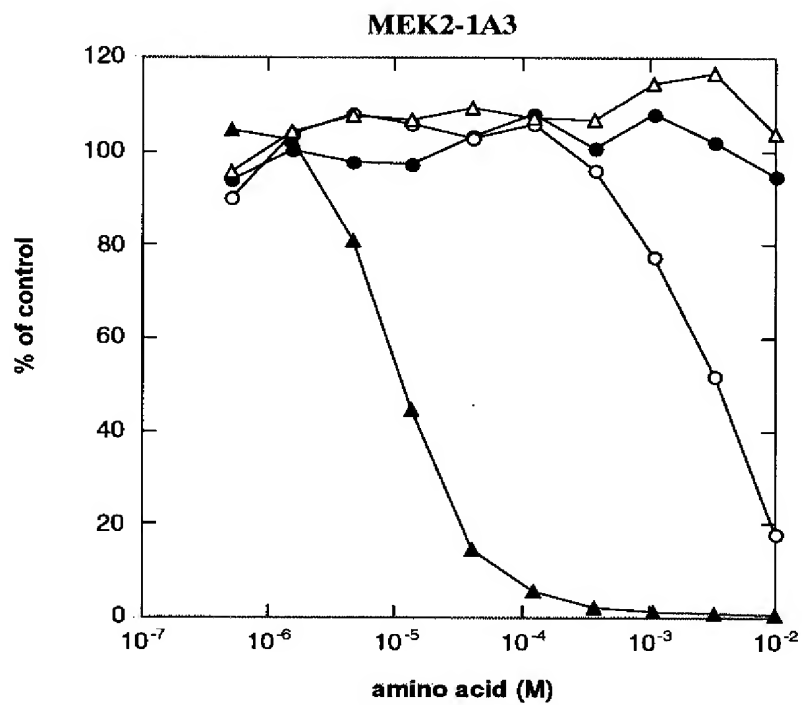
[図4-3]

**D****E**

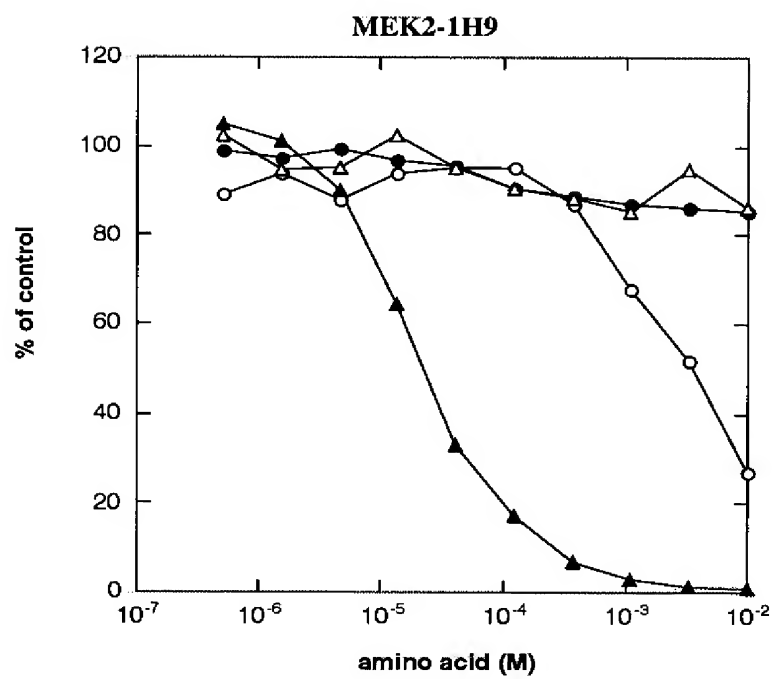
12/15

[図4-4]

F

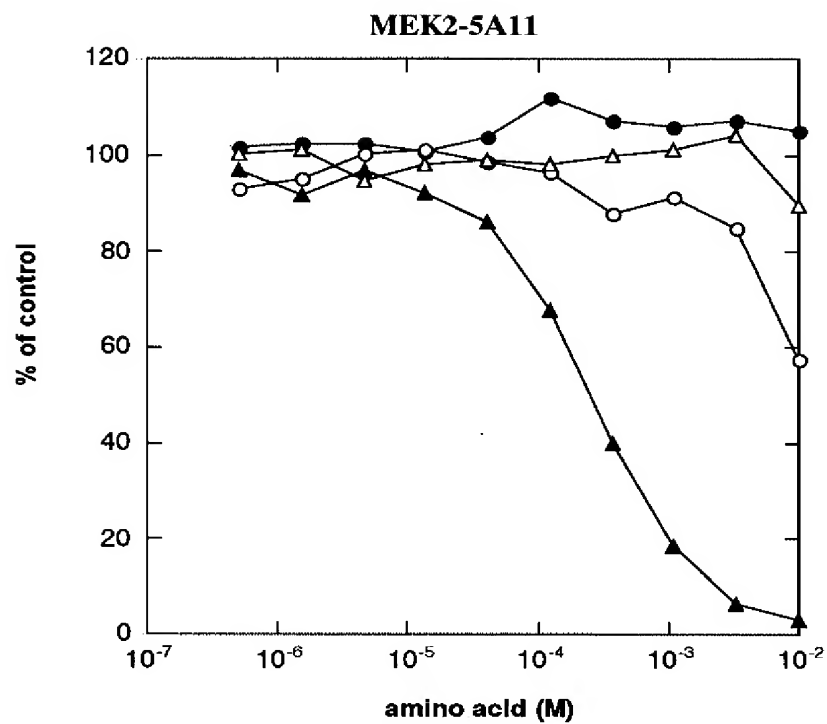


G

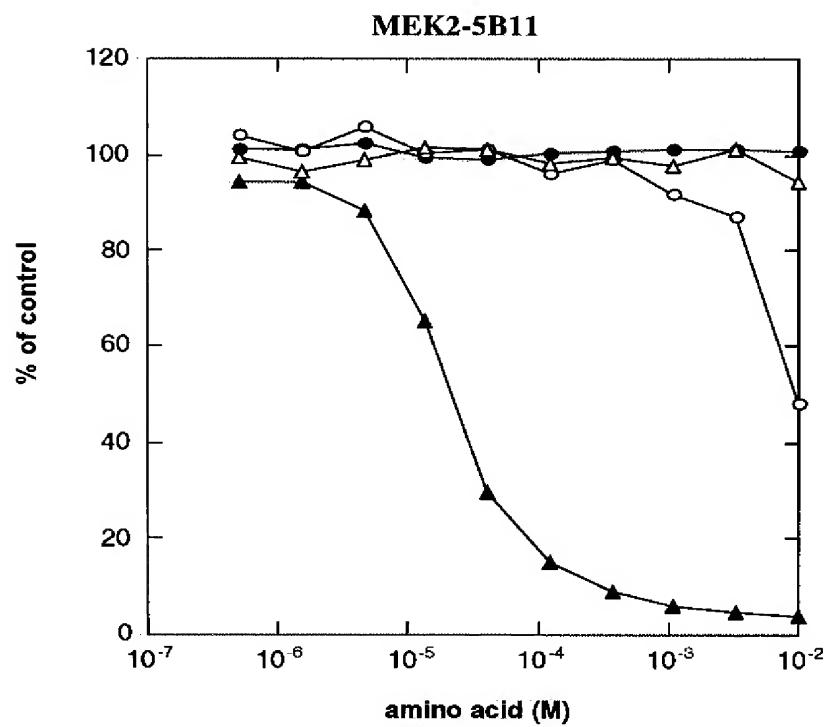


[図4-5]

H

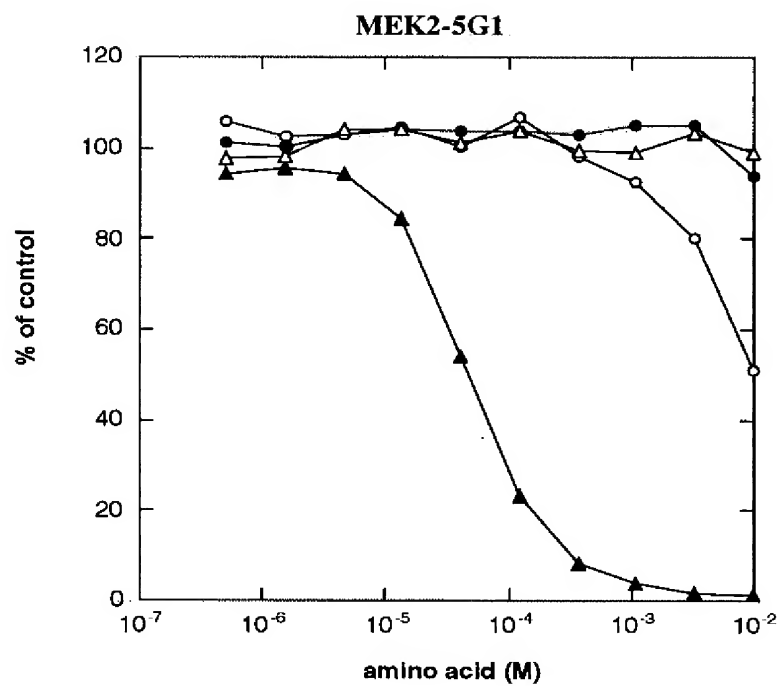


I

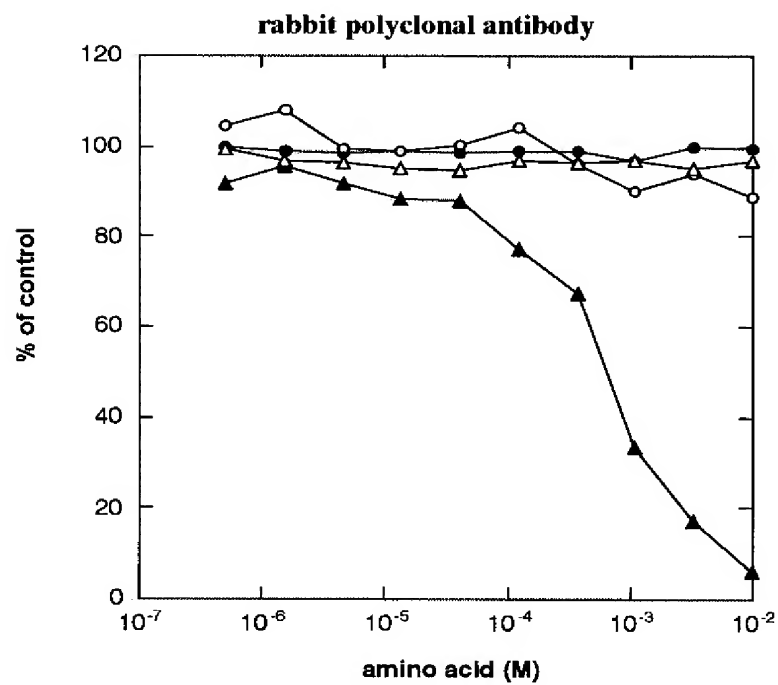


[図4-6]

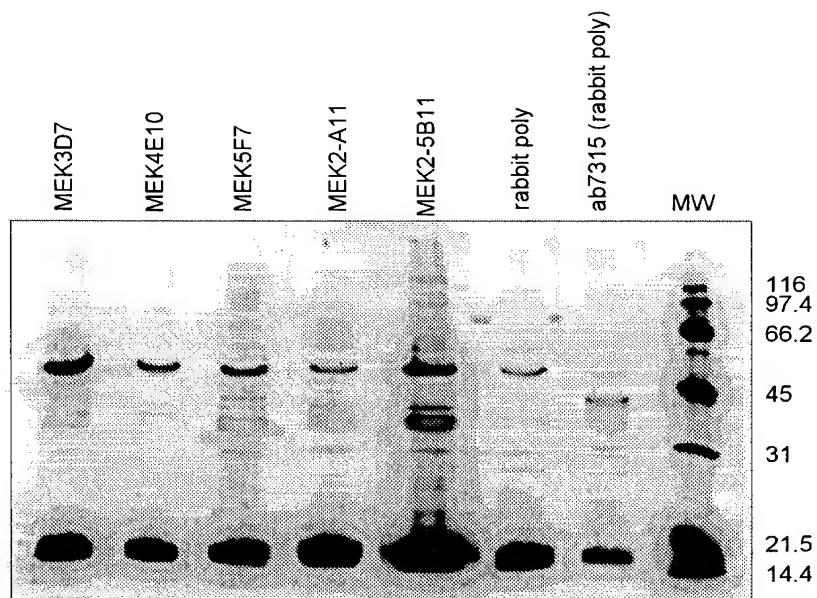
J



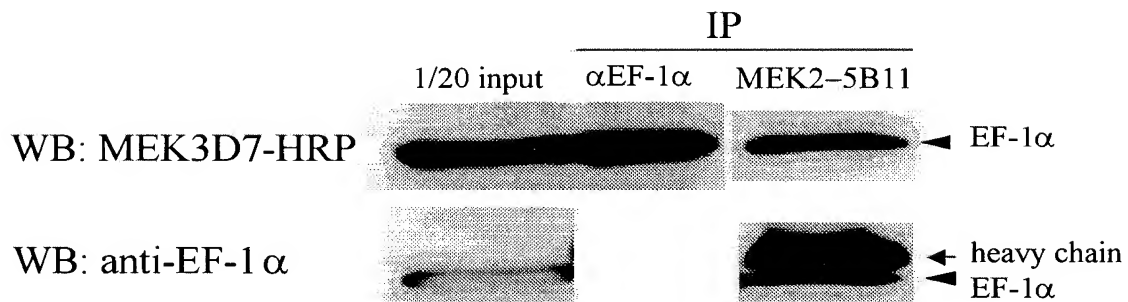
K



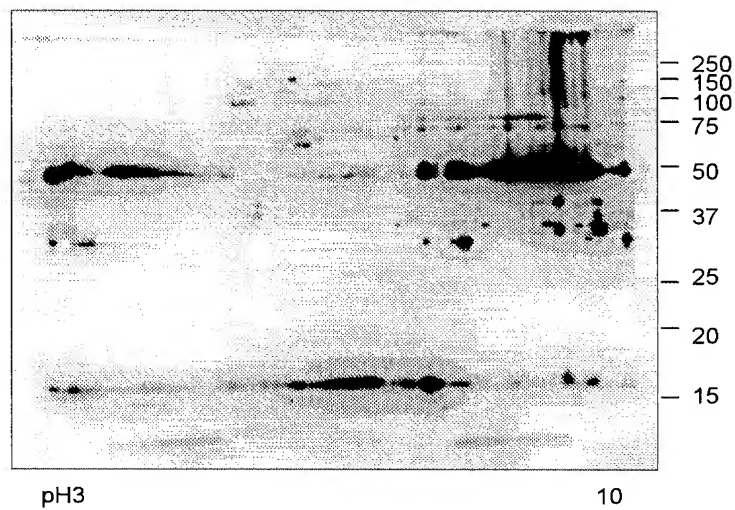
[図5]



[図6]



[図7]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017959

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/44, C12N5/18, C12P21/08, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/44, C12N5/18, C12P21/08, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/18418 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION), 07 March, 2002 (07.03.02), Full text & EP 1313756 A & US 2004/0053848 A	1, 5, 6, 11
X	PETHE, K. et al., "Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, (2002), Vol.99, No.16, pages 10759 to 10764; full text	1-3, 6, 11
O, X	"Product Datasheet for ab7766", [online], ABCAM LTD., 2002. [retrieval date: 17 February, 2005 (17.02.05)], <URL:http://www.abcam.com/framework/popups/popup_printable_ds.cfm?intAbID=7766>	1, 3-8, 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 February, 2005 (21.02.05)

Date of mailing of the international search report  
15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017959

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 11 are divided into four groups including: the inventions having a special technical feature in "an anti-methyllysine antibody binding specifically to dimethyllysine and monomethyllysine", those having a special technical feature in "an antibody having a higher reactivity to dimethyllysine than to monomethyllysine", those having a special technical feature in "an anti-methyllysine antibody being a polyclonal antibody", and those having a special technical feature in "a process for producing a monoclonal antibody which comprises immunizing an animal with an antigen obtained by chemically methylating a protein, and, from among the obtained antibodies, (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claim 1, 2 and the parts of claims 3 to 11 relating to an anti-methyllysine antibody binding specifically to dimethyllysine and monomethyllysine.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017959

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

selecting a hybridoma secreting an antibody capable of recognizing a protein obtained by chemically methylating a protein different from the antigen".



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 7 C07K 16/44, C12N 5/18, C12P 21/08, G01N 33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 7 C07K 16/44, C12N 5/18, C12P 21/08, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/18418 A1, (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION), 2002.03.07, 全文 & EP 1313756 A & US 2004/0053848 A	1,5,6,11
X	PETHE, K. et al., "Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002), Vol. 99, No. 16, pp. 10759-10764, 全文	1-3, 6, 11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 02. 2005

国際調査報告の発送日

15. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4 B

3 3 3 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-11 に記載の発明は、「ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する抗メチルリジン抗体」に特別な技術的特徴を有するもの、「ジメチルリジンに対する反応性が、モノメチルリジンに対する反応性よりも優れている抗体」に特別な技術的特徴を有するもの、「抗メチルリジン抗体が、ポリクローナル抗体」であることに特別な技術的特徴を有するもの、「タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択するモノクローナル抗体の製造方法」に特別な技術的特徴を有するものの4つに分類される。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 1,2、及び、請求の範囲 3-11 のうち、ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する抗メチルリジン抗体に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。